

トドマツ (*abies sachalinensis*) 抽出液の吸入がイヌの行動と尿中コルチゾール濃度に及ぼす作用の検討

¹柳澤綾 ¹秋山早紀 ¹加藤翼 ¹篠塚直哉 ¹加隈良枝 ²金子俊彦 ²小澤洋平

¹帝京科学大学生命環境学部アニマルサイエンス学科

²日本かおり研究所株式会社

The effects of the aroma of essential oil extracted from *Abies sachalinensis* on behavior and urinary cortisol in dogs.

¹Aya YANAGISAWA ¹Saki AKIYAMA ¹Tsubasa KATO ¹Naoya SHINOZUKA
¹Yoshie KAKUMA ²Toshihiko KANEKO ²Yohei OZAWA

¹ Teikyo University of Science, Department of Animal Sciences

² Japan Aroma Laboratory Co.,Ltd.

キーワード：トドマツ、香り、イヌ、行動、活動量、尿中コルチゾール濃度
Keywords: *abies sachalinensis*, odor, dogs, behavior, activity level, urinary cortisol

I. 序論

トドマツ (*abies sachalinensis*) はマツ科モミ属の樹木で北半球に多く分布している。日本では昭和30年以降、拡大造林政策によって多くの針葉樹人工林が造作され、北海道においてもトドマツなどが広く植栽された¹⁾。このトドマツの間伐時に発生する木材や樹皮は、木質バイオマス原料や燃料用ペレットなどへの利用が拡大しているが、葉などの林地残材は有効な利用法が開発されておらず、その用途開発が重要な課題となっていた。大平らはこれらの葉枝から減圧式マイクロ波水蒸気蒸留装置 (VMSD) を用い、精油を効率的に抽出する方法を確立した²⁾。この製法で抽出されたトドマツ抽出液は、 α -ピネン、カフェイン、 β -フェランドレン等のモノテルペン類を多く含み²⁾「クリアフォレスト」という製品群としてエステー株式会社 (日本、東京) より商品化されており、 β -フェランドレン等の作用により大気中の二酸化窒素 (NO₂) を無害化することが確認されている³⁾。

トドマツの精油および主成分である α -ピネンのマウスへの抗不安効果を高架式十字迷路タスクを用い検証した実験では、腹腔内投与では抗不安効果をもたらさなかった一方で、吸入による投与では抗不安効果をもたらしたと報告されている⁴⁾。ヒトにおいても、森林浴には血圧の低下⁵⁾や唾液中コルチゾール濃度の低下⁶⁾が報告されており、その作用機

序として樹木からの香り成分 (モノテルペン類やセスキテルペン類) による効果が注目されている^{6, 7)}。

近年、嗅覚刺激を用いた動物の行動の変化やストレス緩和効果の検証が行われている。アニマルシェルターに収容されたイヌでは、ラベンダーとカモミールの香りの提示により休む時間が多くなり、移動する時間と発声が減少するなどの鎮静効果が示された一方で、ローズマリーとペパーミントの香りは立位や移動する時間、発声を増加させた⁸⁾。その他にも、ローズマリーの精油を吸入することでマウスが⁹⁾、ペパーミントの香りを提示することで飼育下のライオンが^{10, 11)}活動を活発にしたことから、適切な香りの提示はイヌに対し鎮静効果を示し、それらの物質を飼育環境に拡散させることは飼育動物のストレス軽減につながる⁸⁾ことが示唆されている。

そこで本研究では、トドマツ抽出液の香りをイヌに提示することによって、新奇環境におかれたイヌの行動、活動量、また、非侵襲的なストレス反応の指標である尿中コルチゾール濃度に違いがみられるか明らかにすることで、イヌにおけるトドマツの抽出液の香りによるストレス軽減効果について検討した。

II. 材料と方法

1. 対象犬と実験環境

一般家庭で飼育されている1歳2ヶ月齢から9歳

8ヶ月齢（M=5.65、SD=3.94）の犬6頭（雄2頭、雌4頭）を実験に供試した（表1）。対象犬にとって未知である実験室に、実験用サークル（7.8m×7.8m）を設置した。実験中の行動および活動量を計測するために実験用サークル内にイヌを単独で収容し、新奇環境での飼い主との隔離状態というストレス負荷を行った。有香条件（実験群）および無香条件（コントロール群）の2条件で、各4時間ずつ実験サークル内で自由に過ごさせた。室内の空調および温度をふまえ、においを実験室内に拡散させるために有香条件（実験群）では、VMSD法により抽出されたトドマツ抽出液（日本かおり株式会社製造）を浸透させたパルプシート（11cm×9.5cm）4枚を実験用サークル中央の高さ2mの場所に吊り下げてにおいを提示し、無香条件（コントロール群）では、なにも浸透させていないパルプシートのみを同様に提示した。実験者はガラス窓で仕切られた別室で待機した（図1）。1日1条件の実験を行い、2条件間は1週間以上の間隔を空け、順序効果を考慮してカウンターバランスをとるため、2個体は有香条件（実験群）を、4個体は無香条件（コントロール群）を先に行った。

2. 行動観察

各条件での実験サークル内のイヌの行動をビデオカメラ（JVC, GH-HM690）2台を用いて実験が終

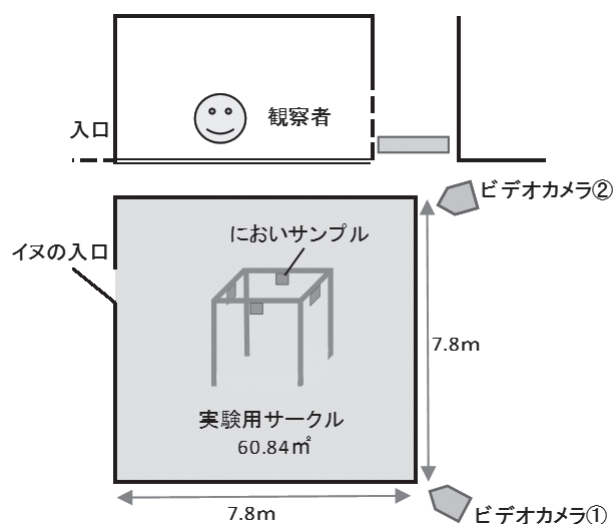


図1 実験環境

了するまで撮影した。撮影されたビデオ映像により実験中の犬の行動を観察し、集計を行った。観察した行動項目は、表2に示した。

犬の状態およびイベントとして、姿勢（立位・座位・伏せ）、歩行、探索行動を1分ごとの瞬間サンプリングにより回数を集計した。また、「あくび」は急性ストレス行動に関連する行動^{12, 13)}であり、「鼻舐め」「身震い」は不快な刺激に対する反応を和らげる行動である¹³⁾とされていることから、それぞれの行動の実験時間内の総回数を集計した。以上

表1 実験に供した対象犬

個体名	犬種	性別	避妊去勢	年齢	体重(kg)	体高(cm)	体長(cm)
A※	ミニチュア・ダックスフンド	メス	済	8歳10ヶ月	6.4	27	40
B※	ミニチュア・ダックスフンド	メス	済	3歳6ヶ月	6	18	40
C	雑種	メス	済	9歳	9.9	45	51
D	トイ・プードル	オス	未	9歳8ヶ月	8.15	43	42
E	トイ・プードル	オス	済	1歳9ヶ月	3.25	35	33
F	ウェルシュ・コーギー・ペンブローク	メス	済	1歳2ヶ月	8.3	45	28

※有香条件を先に実験した個体

表2 観察した行動と定義

行動	定義
立位	四肢伸展位
座位	前肢伸展位・後肢屈曲位
伏せ	体幹が伏せている／体幹の左右何れかが地面に接触する。
歩行	連続した四肢による左右交差運動
探索行動	物品や地面の匂いを嗅ぐ／物音などに対して注意している状態
あくび	大きく口を開きあくびをする
鼻舐め	鼻や口周りを舐める
身震い	体を激しく左右にゆする

の行動の回数について条件間で比較するために、ウィルコクソンの符号付き順位検定を行った。

3. 加速度データロガーによる活動量の測定

犬の活動量を測定するために加速度計測器データロガー (Onset, HOBO Pendant® G Data Logger: 大きさ58×33×23mm、重さ18g) を犬の頸部腹側に装着し、X軸の加速度を2秒間隔で記録した。振れ幅0.5m/s²以上で動的行動、振れ幅0.5m/s²未満で静的行動とした。実験時間4時間の動的活動回数を集計し、条件間の比較のためにウィルコクソンの符号付き順位検定を、各条件の時間経過による活動量の比較のためには二元配置分散分析を行った。

4. 尿中コルチゾール濃度 (UCCR) の測定

実験後8時間以内に自然排尿された尿を採取し、尿中コルチゾール濃度を測定した。採取された尿は、サンプルチューブ2本に分注し、-30℃で抽出を行うまで冷凍保存をした。1日の排泄量が一定とされている尿中クレアチニン濃度との比 (Urine Cortisol Creatinine Ratio: UCCR) を算出する¹⁴⁾ ために、コルチゾール及びクレアチニンの測定を行った。

尿サンプルの抽出

冷凍保存していた尿サンプルのうち1本を室温で融解させ、混和した尿サンプルをガラスチューブに50μL分注し、ドラフト内でジエチルエーテルを2mLずつ添加後、ダイレクトミキサー (AS ONE, DM-301) で4分間混和し、その後10分以上静置させた。メタノールで冷却した-80℃の投げ込みクーラー (EYELA, SBS-11) に10分間入れて水分を凍結させた後、エーテル層だけを別のガラスチューブに回収した。その後、42℃に設定したドライバス (EYELA, MG-2200) で窒素を吹き付けながら蒸発乾固させた後、EIAバッファーを500μLずつ加え、ダイレクトミキサーで10分間混和させた。抽出したサンプルは2mLチューブに分注し、-30℃の冷凍庫に入れ保存した。尿サンプルは採取してから2週間以内に抽出を行った。

尿中コルチゾール濃度の測定

抽出した尿サンプルについて、2抗体法EIAによるコルチゾール濃度の測定を行った。Horseradish peroxidase (HRP) 標識ホルモンとしてCortisol-3-CMO-HRP (コスモバイオ, FKA403) と、1次抗体として抗コルチゾール血清であるanti Cortisol-3-CMO (コスモバイオ FKA404-E) を使用した。マ

イクロプレート (EIA/RIA Plate, 96well costar 9018) のコーティングには2次抗体として抗ウサギ-IgG (H+L)-ヤギ血清 (CPL 55602, Lot#: 06472) を使用した。2次抗体はcoating bufferで希釈し、ディスペンサーでマイクロプレートに分注を行った。分注したマイクロプレートを室温で約24時間インキュベートし、well内の液を捨て、Assay bufferを入れて保存し、コーティング済みのマイクロプレートは4℃で冷蔵保存し、3か月以内に使用した。使用時にはプレートウォッシャー (BIO-RAD Immuno wash 1575) で2回洗浄後、抽出済みサンプルおよびコントロールサンプル、段階希釈したスタンダードを25μLずつ分注した。その後1次抗体とHRP標識ホルモンをそれぞれ20~25万倍に希釈したものを100μLずつ分注し、プレートを遮光容器に入れ、約4℃ (冷蔵庫) で保管した。翌日、インキュベーションしたプレートをプレートウォッシャーで4回洗浄し、過酸化尿素、テトラメチルベンジジン、ジメチルスルホキシド溶液を直前に混和したものを基質液として150μLずつ分注し、25~30℃で40分間おいて反応させた。その後、硫酸を加え反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで450nmの波長により測定し、解析ソフト (BIO RAD, Microplate Manager® 6 Version6.3) によりサンプル中のコルチゾール濃度を算出した。

尿中クレアチニン濃度の測定

尿中クレアチニン濃度の測定には、クレアチニン測定キット (富士フイルム和光純薬株式会社 LabAssay™ Creatinine) を使用した。-30℃で冷凍保存した尿サンプル1本を室温で融解し、10μLのサンプルを50倍に希釈して使用した。

尿中コルチゾールと尿中クレアチニン濃度の比 (UCCR) の算出方法

UCCRは、次の計算式を用いて算出した。

【計算式】

$$\text{コルチゾール濃度 (ng/ml} = \mu\text{g/l)} \div 362.5 \text{ (分子量)} = (\mu\text{mol/l}) \quad (1)$$

$$\text{クレアチニン濃度 (mg/dl)} \times 10000 \div 113 \text{ (分子量)} = (\mu\text{mol/l}) \quad (2)$$

$$(1) \div (2) = \text{UCCR}$$

条件間の比較には、UCCRを算出し、対応のあるt検定を行った。

Ⅲ. 倫理的配慮

本実験は、帝京科学大学「動物委員会」に関する倫理委員会の承認 (第16C027号) を受けて実施した。

IV. 結果

1. 条件間による行動回数の比較

各条件における1分間ごとの行動の全個体の平均回数を表3に示した。立位、座位、伏せ、歩行、探索行動すべてにおいて有香・無香条件間に有意な差 ($p>0.05$) は認められなかった。変動係数から (CV $>28.05\%$) 個体間でのばらつきも大きかった。

また、ストレスの指標行動の実験時間内の総回数を表4に示した。身震い ($p=0.27$)、あくび ($p=0.53$)、鼻舐め行動 ($p=0.46$) は個体により違いはみられるものの、すべてにおいて有香条件の方が平均回数は多かったが、条件間に有意な差は認められなかった。また、個体ごとの変化として無香群のほうが行動回数が減少した個体は、身震いは3個体 (2個体は変化がなく、1個体は増加した)、あくびは3個体 (3個体は変化がなかった)、鼻舐め行動は4個体 (2個体は増加した) だった。

2. 加速度計測器データロガーによる活動量の比較

実験時間中の総活動量の平均±標準偏差およびCVは、有香群 3161.2 ± 1277.3 、CV = 40.41%、無香群 3545.0 ± 945.4 、CV = 26.67%であり、有香群が無香群よりも低下しているが、個体ごとのばらつきが大きく条件間で有意な差は認められなかった ($p=0.67$)。対象犬ごとの活動量を図2に示した。活動

量が有香群では2個体は低下しており、3個体は変化が僅かだった。

また、活動量の時間経過による活動量の結果は、導入直後は両条件とも活動量の平均値が高いが時間経過とともに低下する傾向がみられた。すべての時間において有香群のほうが低く、香りの有無による主効果 ($p=0.24$)、香りの有無と時間経過による交互作用 ($p=0.90$) とともに有意な差は認められなかった (図3)。

各条件におけるUCCRの平均±SDおよびCVは、有香群 $5.05 \times 10^{-05} \pm SD4.12 \times 10^{-05}$ 、CV = 81.68%、無香群 $3.71 \times 10^{-5} \pm SD4.22 \times 10^{-05}$ 、CV = 113.62%であり、有香群のほうがUCCRは高い結果となったが、有意な差は認められなかった ($p=0.23$)。

また、対象犬の個体ごとのUCCRを図4に示した。6頭中4頭が有香群で、2頭が香り無香群でUCCRが高いという結果になった。UCCRは個体ごとにばらつきが大きく、A、B、Cが高値群、D、E、Fが低値群となった。

V. 考察

本研究において、トドマツ抽出液による香り提示の有無によって、イヌの行動量の平均値、活動量の平均値、尿中コルチゾール濃度 (UCCR) の平均値すべてにおいて差 ($p>0.05$) は認められなかった。

表3 各行動の平均回数 (n=6)

	条件	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	CV	Z	p
立位	有香群	45	41	153	96	44	119	83.00	47.10	56.75	0.73	0.46
	無香群	30	46	128	115	51	76	74.33	39.62	53.30		
座位	有香群	39	47	4	1	21	25	22.83	18.36	80.39	0.52	0.60
	無香群	21	91	13	0	10	45	30.00	33.51	111.71		
伏せ	有香群	145	153	77	145	170	65	125.83	43.61	34.66	0.52	0.60
	無香群	184	97	98	126	178	113	132.67	38.98	29.38		
歩行	有香群	18	18	66	28	11	60	33.50	23.56	70.33	0.31	0.75
	無香群	17	16	47	58	19	33	31.67	17.61	55.62		
探索行動	有香群	96	114	99	107	76	167	109.83	30.81	28.05	0.52	0.60
	無香群	59	133	118	61	48	206	104.17	60.75	58.32		

表4 ストレス指標行動の平均回数 (n=6)

	条件	A	B	C	D	E	F	Mean	SD	CV	Z	p
身震い	有香群	0	2	2	6	3	1	2.33	2.07	88.53	1.10	0.27
	無香群	1	1	2	3	2	1	1.67	0.82	48.99		
あくび	有香群	0	0	2	8	4	0	2.33	3.20	137.32	0.63	0.53
	無香群	1	1	1	4	1	1	1.50	1.22	81.65		
鼻舐め行動	有香群	211	22	24	47	21	15	56.67	76.41	134.83	0.73	0.46
	無香群	190	15	18	74	24	0	53.50	71.45	133.56		

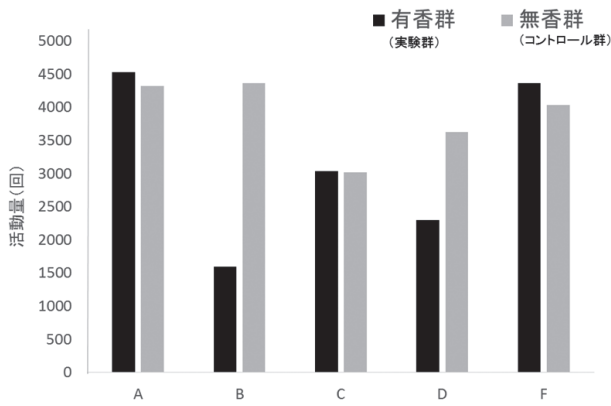


図2 対象個体ごとの活動量 ($n=5$; 計測不能 $n=1$)

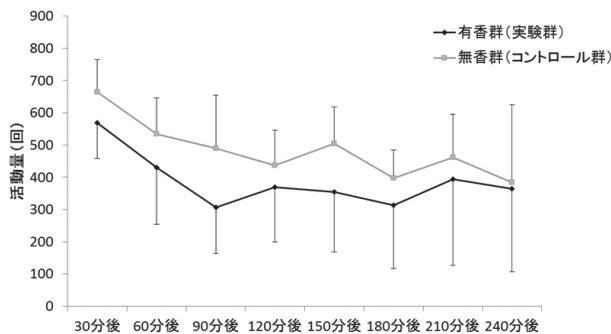


図3 平均活動量 (+SD) の経時推移 ($n=5$; 計測不能 $n=1$)

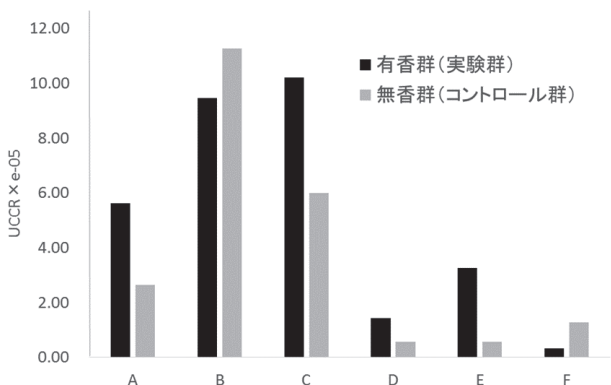


図4 対象個体ごとのUCCR ($n=6$)

本研究では、一般家庭犬でのトドマツ抽出液の香りに対する反応を調べることにより、そのストレス軽減効果への応用の可能性を検討しようとしたが、イヌは本来個性豊かな動物であることに加え、本研究における対象犬の飼育環境や属性が多様であったことから、行動、活動量、UCCRの反応にも個体差がみられた。

行動観察では条件間に統計的な有意差は認められなかったものの、個体によるばらつきは大きかった。ストレスの指標として計測したあくび、身震い、鼻舐め行動は、すべて有香群で多くみられる個体が多かった。一方、加速度計測器データロガーに

よる活動量の計測では、無香群のほうが活動量の平均値が高く、また個体ごとで活動量を比較した場合でも、有香群で活動量が減少している個体が2個体、変化がない個体が3個体であることから、有香群では活動量が減少していた。これらのことから、あくびや身震い、鼻舐め行動の増加は、ストレス反応というよりも、単に嗅覚刺激に対する反応として起きていた可能性も考えられる。

UCCRにおいても、個体によりばらつきがみられたものの、有香群と無香群において、有意な差は認められなかった。さまざまな年齢の健康なイヌのUCCRを調べた研究では、平均が 2.9×10^{-6} ($= 29 \times 10^{-5}$)であった¹⁴⁾。また、別の研究では、健康なイヌ20頭の平均は 5.7×10^{-6} ($= 57 \times 10^{-5}$)であった¹⁵⁾。測定方法の違いも考えられるが、本研究の平均は有香群では 5.05×10^{-5} 、無香群では 3.71×10^{-5} であり、両群とも低値であった可能性がある。イヌのストレス反応に関する研究は、イヌを断続的に大きな音にさらすことによりストレスを誘発する実験などが行われてきたが、近年では倫理的な理由から、実験動物の福祉を劇的に損なう恐れのある方法は受け入れられない¹⁵⁾ため、社会的および空間的制限によるストレス誘発による研究が行われている¹⁶⁾。本実験は未知の場所に設置した実験サークルに単独で収容することで、他のヒトやイヌから社会的に隔離し、行動範囲を空間的に制限した環境で実験を実施することで、対象犬へのストレス誘発を試みたが、対象犬にとって本実験の実験環境がストレス負荷状態ではなく、UCCRにも差が現れなかった可能性も考えられる。

Graham *et al.*によると⁸⁾ 香りの種類によってイヌの行動を変化させ活動量を増加させる香りと減少させる香りがあることが示唆されているが、本研究ではトドマツ抽出液による香りの有無で、行動、活動量、尿中コルチゾール濃度への作用は認められなかった。ラベンダーの精油をヒトに使用する場合の推奨使用量の1/2をイヌに吸入させた実験では、香りの吸入中はパンティングが減少し、伏臥位及び丸くなる姿勢の発現時間が増加したことから、香りによるリラックス効果が示唆された¹⁷⁾との報告もあることから、香りの濃度を調整することや、対象犬の条件を統一し、より多くの個体を用いた実験を行うことで、今後、イヌにおいてもトドマツ抽出液の香りによるストレス軽減効果を確認できるかもしれない。

謝辞

本研究は、日本かおり研究所株式会社から本学（加隈良枝）への奨学給付寄附金の支援と実験材料の提供を受けて実施した。

引用文献

- 1) 猪瀬光雄：北海道の森林資源の現状を考える，*北方林業* 49 (12)：269-272, 1997.
- 2) 太平辰朗：減圧式マイクロ波水蒸気蒸留法による樹木精油の効率的抽出，*AROMA RESEARCH*, 1 (2)：48-55, 2010.
- 3) 大平辰朗：樹木精油を利用した環境汚染物質の無害化剤，*研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム A-STEP成果集*, 7, 2015.
- 4) Satou T., Matsuura M., Takahashi M., Umezu T., Hayashi S., Sadamoto K., Koike K.: Anxiolytic-like effect of essential oil extracted from *Abies sachalinensis*, *Flavour Fragrance Journal*, 26 : 416-420, 2011.
- 5) Q. Li, K. Morimoto, M. Kobayashi, H. Inagaki, M. Katsumata, Y. Hirata, K. Hirata, H. Suzuki, Y. I. Li, Y. Wakayama, T. Kawada, B. J. Park, T. Ohira, N. Matsuf, T. Kagawa, Y. Miyazaki and A. M. Krensk: Visiting a Forest, but Not a City, Increases Human Natural Killer Activity and Expression of Anti-Cancer Proteins, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 21 (1) : 117-127, 2008.
- 6) 宮崎良文：森林浴の生理的効果（3）－コルチゾール，血圧，脈拍数，心拍数を指標として，*日本生理人類学会誌*, 11 : 44-45, 2006.
- 7) 恒次裕子，森川岳，宮崎良文：木材の香りによるリラクゼーション効果，*木材工業*, 60 : 598-602, 2005.
- 8) Graham L., Wells DL, and Hepper PG: The influence of olfactory stimulation on the behavior of dogs housed in a rescue shelter. *Applied Animal Behaviour Science*, 91 : 143-153, 2005.
- 9) Kovar KA, Gropper B, Friess D, and Ammon HTP.: Blood levels of 1, 8 cineole and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of rosemary oil, *Planta medica*, 53 : 315-318, 1987.
- 10) Pearson J.: Novel objects and scent enrichment for Asiatic lions, *Shape of enrichment* 11 : 7-10, 2002.
- 11) Powell D. M.: Preliminary evaluation of environmental enrichment techniques for African lions (*Panthera leo*), *Animal Welfare*, 4 : 361-370, 1995.
- 12) Bonne Beerda, Matthijs B. H. Schilder, Jan.A. R. A. M. van Hooff, Hans W. de Vries: Manifestations of chronic and acute stress in dogs, *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 52 : 307-319, 1997.
- 13) Rugaas T, 山崎恵子（訳），Ryan T.（監修）：犬語の世界へようこそ！－カーミング・シグナル－，ペットライフ社，東京，1997.
- 14) Henry, C. J., Clark, T. P., Young, W., Spano, S. Joseph.: Urine cortisol: Creatinine ratio in healthy & sick cats, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 10 (3) : 123-126, 1996.
- 15) Bonne Beerda, Matthijs B. H. Schilder, JAN A. R. A. M. Van Hooff, Hans W. De Vries, Jan Amol: Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. I. Behavioral Responses, *Physiology & Behavior*, 66 (2) : 233-242, 1999.
- 16) Bonne Beerda, Matthijs B. H. Schilder, JAN A. R. A. M. Van Hooff, Hans W. De Vries, Jan A. mol: Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. II. Hormonal and Immunological Responses, *Physiology & Behavior*, 66 (2) : 243-254, 1999.
- 17) 福澤めぐみ，阿部紗裕理：ラベンダーアロマエッセンシャルオイルの吸入曝露に対するイヌの反応，*Animal Behaviour and Management*, 50 (4) : 153-161, 2014.